PG Research

株式会社 PG リサーチ
〒187-0002 東京都小平市花小金井 4-13-11

アルギン酸三次元培養キット

がん細胞などの形質転換細胞は、正常細胞と異なり足場非依存性の増殖能を有します。また、軟骨細胞などの一部の正常細胞においても足場非依存性の増殖が認められ、単層培養に比較して分化形質の発現が強いことが知られています。この足場非依存性の増殖を検出する方法として、軟寒天培養法が古くから使用されています。軟寒天培養法は、細胞を軟寒天ゲル中に浮遊させた状態で培養しますが、寒天は冷却されると凝固してしまうため、37℃付近に保った状態で瞬時に細胞の播種を行わなければなりません。また、培養後に細胞を回収する際にも特殊な試薬が必要で、細胞の機能解析には不適切な面があります。

一方、同じ海藻由来のアルギン酸は、カルシウムの存在下でゲル化し、しかも、キレート剤によりカルシウムを除去することで溶液となります。このように培養した細胞のみを容易に回収できるため、細胞の三次元培養に使用されています。

アルギン酸三次元培養キットは、ビーズ状のアルギン酸ゲルを簡便に作製するために最適化されたキットで、各種がん細胞をはじめ軟骨細胞などの三次元培養にご使用いただけます。

１）キットの構成

①アルギン酸ナトリウム溶液（ABC-AL、25mL、滅菌済）
②塩化カルシウム溶液（ABC-CA、100mL x 2 本、滅菌済）
③クエン酸ナトリウム溶液（ABC-CI、100mL、滅菌済）
④ゾンデ（4 本、滅菌済）
⑤24well プレート（4 枚、浮遊培養用、滅菌済）

２）キットに含まれない必要な試薬、器具類

①生理食塩液（滅菌済）
②22G 注射針（テルモ、品番：NN-2238R など）
③5mL シリンジ（テルモ、品番：SS-05SZ など）
④スターラーおよび滅菌スターラーバー*
⑤滅菌済みのスペシメンカップあるいは 100mL ビーカー*
⑥滅菌スパーテル（コーニング、3003 など）
*アルギン酸ビーズを直接 24well プレートにて作製する場合（下記、方法 2）は不要

３）アルギン酸ビーズ作製方法

以下に、アルギン酸ビーズの作製方法について例示します。操作は安全キャビネット内にて、無菌的に行って下さい。なお、キット付属の溶液、生理食塩液、培地は、必ず室温に戻してからお使いください。

方法 1（直接 24well プレートに作製する方法）

(1) 付属の 24well プレートの各 well に塩化カルシウム溶液を 2mL ずつ添加する。
(2) 細胞をトリプシン溶液などで回収し、15mLチューブに細胞ペレット（例：1x10^6細胞）を準備する。
(3) 15mLチューブにアルギン酸ナトリウム溶液を 5mL添加し、ピペットにて十分に攪拌し、均一な細胞浮遊液（例：2x10^5細胞/mL）にする。
(4) 5mL シリンジにゾンデを装着し、細胞浮遊液をシリンジ内に回収する。
(5) ゾンデを取り外し、22G 注射針を取り付ける。
(6) 細胞浮遊液を含む 5mL シリンジを 24well 上に垂直に立てて持ち、各 well の塩化カルシウム溶液中に細胞浮遊液を 10 滴ずつ滴下する。滴下の間隔はおおよそ 1 滴／秒とする（1 滴はおおよそ 10μL です）。シリンジの針先が塩化カルシウムの液面から 3～4cm の位置で滴下する **(図 1)**（液面に近い位置で滴下すると、大きなアルギン酸ゲルの塊になります）。
(7) 細胞浮遊液を滴下し終えたら、プレートに蓋をかぶせ、そのまま室温で 10 分間放置する。
(8) well 内のアルギン酸ビーズが固まっていること確認する（**写真 1**）（黒色紙などの上に置いて肉眼でビーズの中心部まで白くなっていることを確認する）。
(9) ピペットを用い、well 内の塩化カルシウム溶液を除去する。ピペットの先を well の底に当てたまま、少し斜めにしてゆっくり吸引すると、ビーズを吸引することなく溶液のみが除去できます。
(10) 各 well に、生理食塩液を 2mL ずつ添加し、室温で 15 分間放置する。
(11) 各 well の生理食塩液を 9)と同様の方法で除去した後、培地 2mL 添加し、室温で 15 分間放置する。
(12) 各 well の培地を 9)と同様の方法で除去した後、培地を 1～2mL 添加し、評価する薬剤等を加え培養を開始する。
(13) 適宜、数日おきに培地交換を行い、コロニーが形成されるまで培養する。

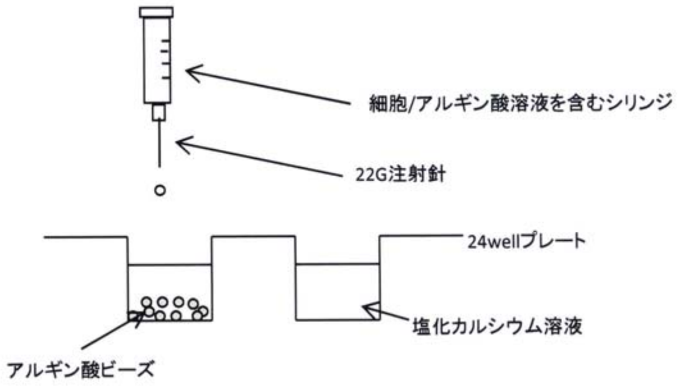


図１

写真１

方法２（スペシメンカップを用い一度に作製する方法）

(1) 滅菌済みの 100mL ビーカーあるいはスペシメンカップに、滅菌済みのスターラーバーを入れ、塩化カルシウム溶液を 50mL 添加する。（スターラーを使わなくてもビーズの作製は可能ですが、攪拌した方がきれいなビーズが出来ます）
(2) 細胞をトリプシン溶液などで回収し、15mLチューブに細胞ペレット（例えば $1x10^6$個）を準備する。
(3) 15mL チューブにアルギン酸ナトリウム溶液を 5mL 添加し、ピペットにて十分に攪拌し、均一な細胞浮遊液にする。
(4) 5mL シリンジにゾンデを装着し、細胞浮遊液をシリンジ内に回収する。
(5) ゾンデを取り外し、22G 注射針を取り付ける。
(6) 塩化カルシウム溶液を含むスペシメンカップをスターラーの上に置き、スターラーバーを回転させる。
(7) 細胞浮遊液を含む 5mL シリンンジをスペシメンカップ上に垂直に立てて持ち、塩化カルシウム溶液中に細胞浮遊液を滴下する。滴下の間隔は、おおよそ 2 滴／秒とし、シリンジの針先が塩化カルシウムの液面から 3cm 以上の位置で滴下する（図２）。
(8) 細胞浮遊液を滴下し終えたら、スターラーを作動させたまま 10 分間放置する。well 内のアルギン酸ビーズが固まっていること確認する（黒色紙などの上に置き、肉眼でビーズの中心部まで白くなっていることを確認する）。
(9) ピペットを用い、カップ内の塩化カルシウム溶液を除去する。25mL ピペットの先を well の底に当てたまま、少し斜めにして吸引すると、ビーズを吸引することなく溶液のみを除去できます。
(10) カップに、生理食塩液を 100mL 添加し、10 分間攪拌する（攪拌しない場合は、15 分間静置）。
(11) カップの生理食塩液を 9)と同様の方法で除去した後、培地 100mL 添加し、10 分間攪拌する（攪拌しない場合は、15 分間静置）。
(12) 24well プレートに培地を 1～2mL ずつ添加する。
(13) カップ中の培地を 9)と同様の方法で除去する。
(14) 滅菌スパーテルを用い、アルギン酸ビーズを 10 個すくい取り、24well プレートの各 well へ加える。
(15) 評価する薬剤等を加え培養を開始する。
(16) 適宜、培地交換を行い、コロニーが形成されるまで培養する（培地の交換については、下記の方法を参照）。

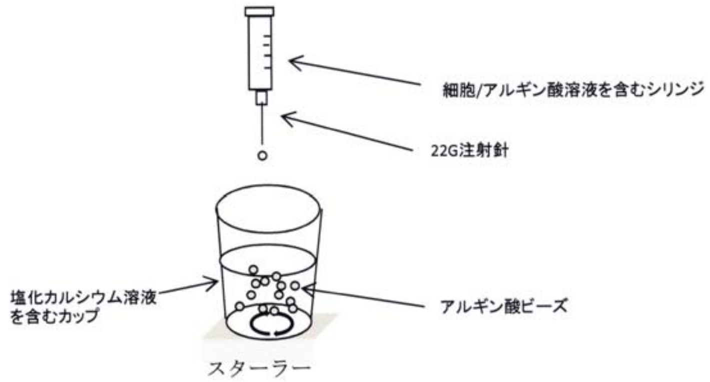


図２

4）培地の交換方法

(1) ピペットの先を well の底に当てたまま、少し斜めにして培地をゆっくり吸引する。
(2) 新鮮培地を添加して、培養を継続する。

5）アルギン酸ビーズから細胞の回収方法

方法 1（プレートの一部の well のみを回収する場合）

(1) well 中の培地を、ピペットを用い除去する。
(2) アルギン酸ビーズを、滅菌スパーテル等を用いて 1.5mL チューブに回収する。
(3) クエン酸ナトリウム溶液 1mL を各チューブに添加し、室温で 5～15 分間攪拌し、アルギン酸を溶解する。
(4) 約 300 x *g*、3 分間遠心する。
(5) 上清を除去して細胞のペレットを回収する。

方法 2（プレートの全ての well を回収する場合）

(1) 全ての well 中の培地を、ピペットを用いて除去する。
(2) クエン酸ナトリウム溶液 1mL を各 well に添加し、室温で 5～15 分間攪拌し、アルギン酸を溶解する。
(3) 溶解液を 1.5mL チューブに回収し、約 300 x *g*、3 分間遠心する。
(4) 上清を除去し、細胞のペレットを回収する。

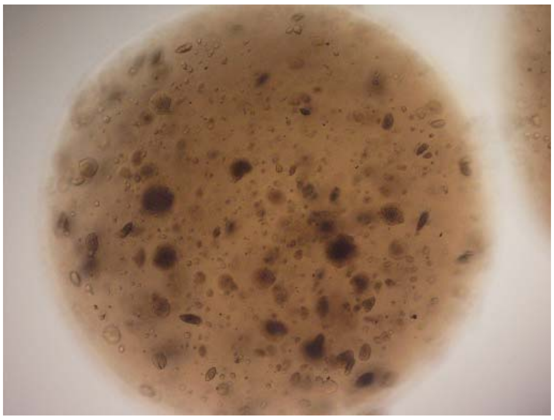
6） 注意事項

(1) 細胞浮遊液を採取あるいは滴下する際の針刺し等には十分ご注意ください。
(2) 軟寒天培養と同様に、細胞種によってはアルギン酸ゲルによる三次元培養が出来ない場合があります。
(3) アルギン酸ビーズの洗浄あるいは培地交換の際に、パスツールピペットを用いた吸引除去を行いますと、アルギン酸ビーズまで吸引してしまいますので、手動のピペットにてゆっくりと吸引してください。
(4) 付属の 24well プレートは浮遊細胞培養用のプレートですが、長期の培養においてはアルギン酸ビーズから脱落した細胞がプレート上で増殖してくることがあります。そのような場合には、アルギン酸ビーズを新しいプレートに移して培養することをお勧めします。
(5) 本品は研究用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれません。

7） 引用文献および参考データ

(1) Chemotherapy screening assay using 3-dimensional cell culture. Cancer Lett, 51,11-16, 1990.
(2) Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. J Orthop Res. 16, 207-216, 1998.

最新の参考データは、www.pg-r.com/ に記載しています。



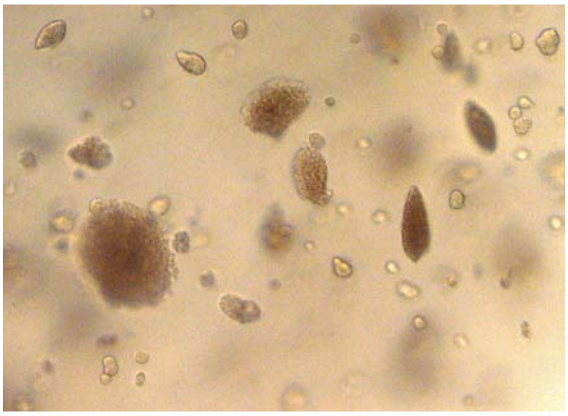


写真 2 (A、B)
アルギン酸ビーズ中で 9 日間培養した HepG2 細胞。（A：低倍率、B：高倍率）

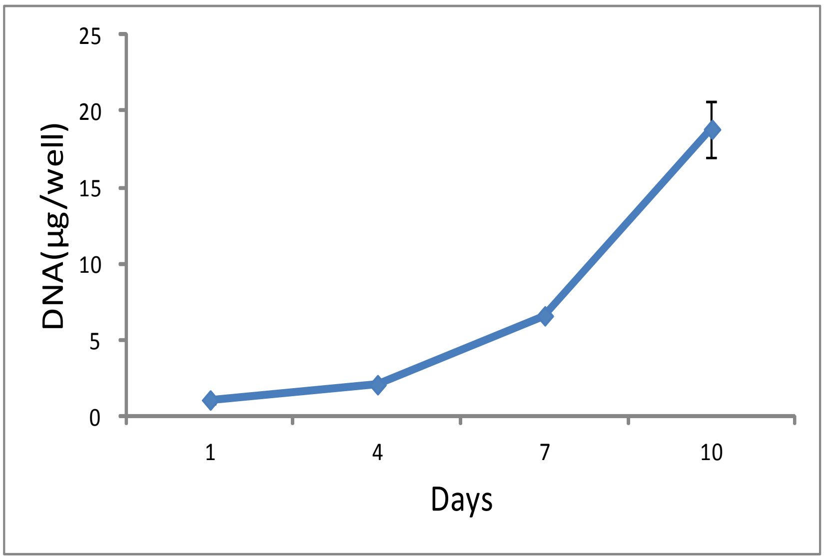


図 3
アルギン酸ビーズ中における HepG2 細胞の増殖（平均±標準偏差、n=3）

<u>８）製品の価格</u>

製品コード	品名	仕様	価格	備考
ABC-KIT	アルギン酸三次元培養キット (24well プレート、4 回分)	1 セット	30,000 円	冷蔵保存
ABC-AL	アルギン酸ナトリウム溶液	25mL	7,500 円	冷蔵保存
ABC-CA	塩化カルシウム溶液	100mL	7,500 円	冷蔵保存
ABC-CI	クエン酸ナトリウム溶液	100mL	7,500 円	冷蔵保存

2012 年 10 月 19 日